

## INTEGRAÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS DE CITROS

ÁLVARO **MISSIATO**<sup>1</sup>; MARIÂNGELA C. **YALY**<sup>2</sup>; MARINÊS **BASTIANEL**<sup>3</sup>; MARCOS  
A. **MACHADO**<sup>3</sup>

Nº 10102

### Resumo

O presente trabalho teve como objetivo ampliar o número de marcadores moleculares nos mapas genéticos de Tangor Murcott vs laranja Pêra e tangerina Cravo vs laranja Pêra, já estabelecidos com marcadores RAPD e AFLP, através da inclusão de marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) e TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) e realizar a integração dos mapas de ligação gênica. Dos 134 primers microssatélites, baseados em seqüências obtidas de DNA genômico, foram selecionados 39 pares de *primers* polimórficos para a população TM x LP e 35 para a população TC x LP. Os tamanhos dos fragmentos entre diferentes alelos e locos variaram de 73 a 320 pares de base. Esses *primers* apresentaram polimorfismo nos parentais, bem como apresentaram segregação nas progênies estudadas. Dezesesseis marcadores SSR se mostraram completamente informativos e foram utilizados como âncoras para combinar os diferentes mapas. Vinte marcadores TRAPs foram incluídos no mapa. O mapa consenso foi obtido a partir das duas populações F<sub>1</sub>, com 276 marcadores moleculares (119 RAPD, 124 AFLP, 20 TRAP e 20 SSR). O programa Joinmap v. 3.0 foi utilizado para calcular a ordem e distância de recombinação para a construção do mapa consenso. Os 276 marcadores foram agrupados em oito grupos de ligação contendo marcadores de todos os mapas individuais, cobrindo 895 cM do genoma de citros. Adicionalmente aos marcadores SSR, marcadores dominantes que segregaram na proporção 3:1 funcionaram como âncoras e foram mapeados em todos os grupos de ligação.

---

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, UNIARARAS, Araras-SP, ✉ [alvaromissiato@gmail.com](mailto:alvaromissiato@gmail.com)

<sup>2</sup> Orientador: Pesquisador, CENTRO APTA CITROS SYLVIO MOREIRA/IAC, Cordeirópolis-SP

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisador, CENTRO APTA CITROS SYLVIO MOREIRA/IAC, Cordeirópolis-SP

## **Abstract**

This study aimed to expand the number of molecular markers in genetic maps of Murcott tangor vs Pêra sweet orange and Cravo mandarin vs. Pêra sweet orange, already established with RAPD and AFLP markers by the inclusion of SSR (Simple Sequence Repeats) and TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) and perform integration of genetic linkage maps. Of the 134 microsatellite primers based on sequences of genomic DNA, we selected 39 pairs of primers for the population TM x LP and 35 for the population TC x LP. The sizes of fragments from different alleles and loci ranged from 73-320 base pairs. These primers showed polymorphism in the parents, as well as the segregation in the progenies. Sixteen SSR markers were quite informative and were used as anchors to combine the different maps. Twenty TRAPS markers were included in the map. The consensus map was obtained from the two F<sub>1</sub> populations, with 276 markers (119 RAPD, 124 AFLP, 20 SSR and 20 TRAP). The program JoinMap v. 3.0 was used to calculate the order and recombination distance for the construction of consensus map. The 276 markers were grouped into eight linkage groups containing markers for all individual maps, covering 895 cM of the genome of citrus. In addition to SSR markers, dominant markers which segregated in the ratio 3:1 functioned as anchors and were mapped on all linkage groups.

## **Introdução**

O Brasil, com uma área cultivada em torno de 820 mil hectares e produção de 327 milhões de caixas de 40,8 kg, mantém há anos a posição de maior produtor mundial de laranja, sendo responsável por aproximadamente 30% da produção mundial (NEVES et al., 2004). Internamente valores expressivos também são alcançados, visto que a laranja representa 49% de toda a produção de frutas do país (Neves & Lopes, 2005).

O melhoramento genético de citros tem se destacado nas últimas décadas, graças à possibilidade de utilização e incorporação de ferramentas de biotecnologia aos programas tradicionais de melhoramento. Nesse aspecto, a utilização de marcadores moleculares para a seleção precoce de plantas de origem sexual, oriundas de cruzamentos dirigidos, possibilitou a seleção de um número elevado de novas combinações e, conseqüentemente, o estabelecimento de um maior número de populações híbridas em campo.

O Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC vem realizando desde 1997, um amplo programa de melhoramento genético de citros via cruzamentos dirigidos. Populações de plantas obtidas de hibridações controlada entre diferentes espécies e variedades de citros foram recentemente estabelecidas em várias regiões do Estado de São Paulo para avaliação de campo, constituindo-se assim em uma ampla rede experimental de potenciais

novos genótipos. Paralelamente, foi estabelecida uma base de dados de seqüências ESTs (CitEST) de diferentes espécies de citros, incluindo bibliotecas feitas a partir de plantas submetidas a várias condições de estresse biótico.

A existência de mapas de ligação, mapeamento de QTLs e o desenvolvimento de bibliotecas de ESTs, já em andamento em nosso laboratório, tornam inevitável e urgente a oportunidade de explorar e combinar todas as informações no sentido de aprofundar os estudos sobre genética desse grupo. A construção de mapas genéticos integrados, com a utilização de diferentes tipos de marcadores moleculares com diferentes segregações, apresenta grandes vantagens, pois permite aumentar a saturação do mapa de ligação e estender a caracterização da variação polimórfica em todo o genoma.

O presente trabalho teve como objetivos ampliar o número de marcadores moleculares nos mapas genéticos de tangor Murcott vs laranja Pêra e tangerina Cravo vs laranja Pêra, já estabelecidos com marcadores RAPD e AFLP, através da inclusão de marcadores SSR e TRAP e realizar a integração dos mapas de ligação gênica.

## **Material e Métodos**

### **Material vegetal**

Material vegetal: Para inclusão de um maior número marcadores SSR e TRAPs, foram utilizadas as seguintes populações: Híbridos tangor Murcott (*Citrus sinensis* vs *Citrus reticulata*) x laranja Pêra (*Citrus sinensis*) (94 plantas) e tangerina Cravo (*Citrus reticulata*) x laranja Pêra (72 plantas). Todos os procedimentos para extração de DNA genômico foram baseados na metodologia descrita por Murray & Thompson (1980), com adaptações introduzidas por Machado et al. (1996).

#### Marcadores Moleculares Microssatélites (SSR)

Cerca de 134 marcadores SSR desenvolvidos a partir de bibliotecas de ESTs de citros foram validados nos genitores e seis indivíduos de cada uma das populações de mapeamento pré-estabelecidas.

Foram selecionados 34 marcadores SSR e genotipados 94 indivíduos da população tangor Murcott x laranja Pêra, 72 híbridos de tangerina Cravo x laranja Pêra visando ampliar o número de marcadores nos mapas pré-estabelecidos.

As reações de amplificação foram conduzidas em 25 µl contendo 50ng de DNA, 1,5 U de Taq polimerase, tampão da reação, MgCl<sub>2</sub> 1,0-2,0 mM, dNTP (0,2 mM) e 0,1 µM de cada primer. A amplificação foi realizada em termocicladores MJ Research Thermocycler (em placas de 96 poços) programados para 30 ciclos de 94°C por 30s, 65-56°C por 30s e

72°C por 5s. A temperatura de anelamento iniciou-se a 65°C caindo 0,3°C a cada ciclo seguido por três ciclos de anelamento a 56°C.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 3 % com brometo de etídio (0,5 ng/mL).

#### Marcadores TRAP (Target Region Amplification Polymorphism)

*Primers Fixos:* Dez *primers* fixos foram desenhados a partir dos genes diferencialmente expressos detectados nos trabalhos com hibridação *in silico* a partir da identificação da sequência no CitEST (Citros EST) de plantas infectadas ou não com o *Citrus tristeza virus* (CTV), gomose de *Phytophthora* e *Xylella fastidiosa* (Cristofani et al., 2007; Campos et al., 2007) que codificam proteínas relacionadas com a síntese da lignina: Cinnamoyl-CoA reductase e Caffeic acid-O-Methyltransferase; relacionadas com a síntese de sacarose: sucrose synthase; com a síntese de etileno: ACC Synthase; com o gene *SRG1*, membro da família PR-10 (pathogenesis-related protein 10) que são expressos durante os processos de fotossíntese e senescência das folhas; proteínas relacionadas ao estresse: PR-1, *Cytochrome P450-like protein*, *NBS-LRR type disease resistance protein* e *Miraculin-like protein 2*.

#### Reações de amplificação

As reações de amplificação foram conduzidas a um volume final de 15 µL com os seguintes componentes: 2 µL de 30-50 ng/µL da amostra de DNA, 1,5 µL do 10 × tampão de reação, 1,5 µL of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µL of 5 mM dNTPs, 10 nmol dos primers arbitrários e 10 nmol dos primers fixos e 1,5 U de Taq DNA polymerase. A PCR foi realizada com temperatura de desnaturação do DNA a 94°C por 2 min. A seguir, 5 ciclos a 94°C por 45 s, 35°C por 45 s, e 72°C por 1 min, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 45 s, 50°C por 45 s, 72°C por 1 min e um passo de extensão a 72°C por 7 min.

#### Electroforese dos produtos amplificados

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 2 % com brometo de etídio (0,5 ng/mL).

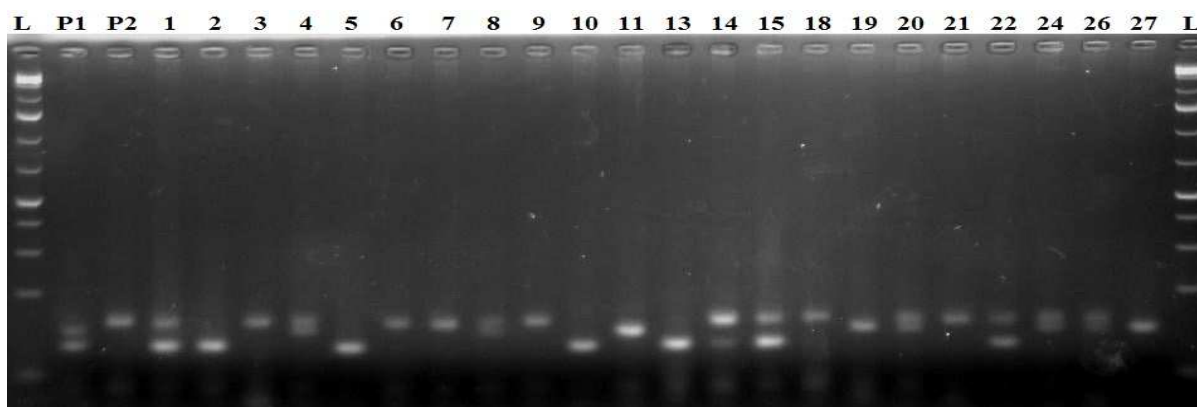
#### Construção dos mapas de ligação

Os marcadores foram inseridos nos mapas de ligação utilizando o programa JoinMap v 3.0 (Van Ooijen & Voorrips, 2001).

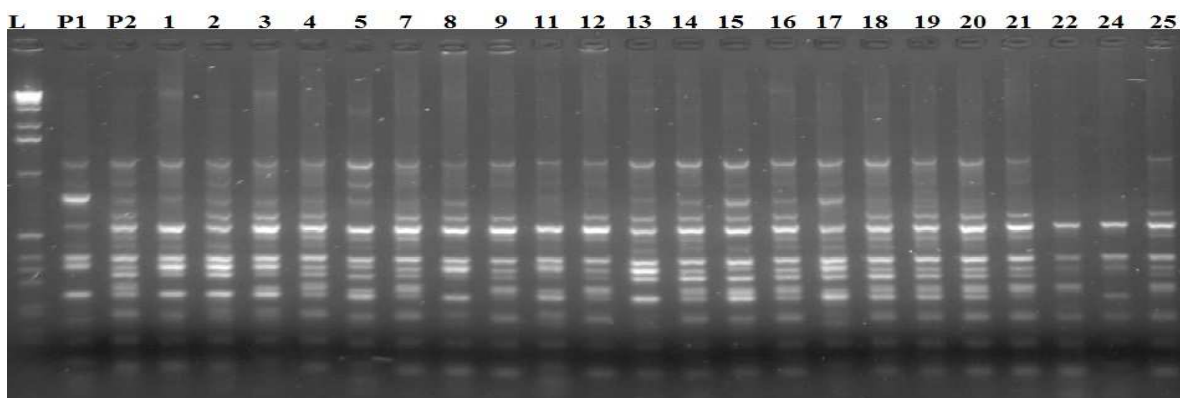
### **Resultados e Discussão**

Dos 134 primers microssatélites, baseados em sequências obtidas de DNA genômico, foram selecionados 39 pares de “primers” polimórficos para a população TM x LP e 35 para a população TC x LP (Figura 1). Os tamanhos dos fragmentos entre diferentes alelos e locos variaram de 73 a 320 pares de base. Esses “primers” apresentaram

polimorfismo nos parentais, bem como apresentaram segregação nas progênies estudadas. Dezesesseis marcadores SSR (Figura 1) se mostraram completamente informativos e foram utilizados como âncoras para combinar os diferentes mapas. Vinte marcadores TRAPs foram incluídos no mapa (Figura 2). O mapa consenso foi obtido a partir das duas populações F<sub>1</sub>, com 276 marcadores moleculares (119 RAPD, 124 AFLP, 20 TRAP e 20 SSR). O programa Joinmap v. 3.0 foi utilizado para calcular a ordem e distância de recombinação para a construção do mapa consenso. Os 276 marcadores foram agrupados em oito grupos de ligação contendo marcadores de todos os mapas individuais, cobrindo 895 cM do genoma de citros. Adicionalmente aos marcadores SSR, marcadores dominantes que segregaram na proporção 3:1 funcionaram como âncoras e foram mapeados em todos os grupos de ligação.



**FIGURA 1-** Gel de agarose 3%; amplificação de fragmentos de DNA utilizando primer microssatélite CCSM 153. P1: tangor Murcott, P2: laranja Pêra (3-11) híbridos. L= marcador de peso molecular Ladder 1 Kb.



**FIGURA 2-** Gel de agarose 2%. Combinação dos primers TRAPs F2 x P3. L= Marcador de peso molecular de 1Kb; P1: tangor Murcott, P2: laranja Pêra; 1 a 25: híbridos.

## Conclusão

A estratégia de mapeamento consenso permitiu o desenvolvimento de um mapa com um número maior de marcadores. A integração dos mapas permitirá a identificação de diferentes genes de interesse agrônômico em um mapa consenso desenvolvido a partir de diferentes populações.

## Referências Bibliográficas

- CAMPOS M. A., ROSA, D. D., TEIXEIRA J. E. C., TARGON, M. L. P. N., SOUZA, A. A., PAIVA, L. V., STACH-MACHADO, D. R., MACHADO, M. A. (2007) *PR* gene families of citrus: an overall from their tissue specific-biotic and abiotic inducible expression profiles based on ESTs approach. *Genetics and Molecular Biology*, v.30, p.917-930.
- CRISTOFANI-YALY, M., BERGER, I. J., TARGON, M. L. P. N., TAKITA, M. A., DORTA S.O., ÁSTUA, J. F., SOUZA, A. A., CAMARGO, R.L.B., REIS M.S; MENDES, B. J., MACHADO, M. A. (2007) Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through ESTs analysis using an in silico hybridization. *Genetics and Molecular Biology*, v.30, p.972-979.
- MACHADO, M. A., COLETTA FILHO, H. D., TARGON M. L. N., POMPEU Jr. J. (1996). Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica* 92: 321-326.
- MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-25.
- NEVES M. F., LOPES, F. F. (2005) O comportamento do consumidor de laranja *in natura* e suco. In: NEVES, M. F., LOPES, F. F. (ed). *Estratégias para a laranja no Brasil*. Editora Atlas, p.170-185.
- VAN Ooijen, J. W., VOORRIPS, R. E. (2001) JoinMap® version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps (software). Wageningen: Plant Research International, 2001. 51p + 1 CD Rom.